

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-313863

(43)Date of publication of application : 02.12.1998

(51)Int.Cl. C12N 15/09
C07K 14/415
C07K 14/745
C12N 1/21
C12N 9/72
C12P 21/02
// (C12N 1/21
C12R 1:19)
(C12N 9/72
C12R 1:19)
(C12P 21/02
C12R 1:19)

(21)Application number : 10-031718

(71)Applicant : H S P KENKYUSHO:KK

(22)Date of filing : 13.02.1998

(72)Inventor : KANAMORI MASAOKI
YANAGI HIDEKI
YURA TAKASHI

(30)Priority

Priority number : 09 85914 Priority date : 19.03.1997 Priority country : JP

(54) MUTANT OF ESCHERICHIA COLI

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new mutant having triple defective mutations in hsl V/V gene, clp PX gene and lon gene, having a function for stabilizing unstable proteins expressed in Escherichia coli and useful for producing foreign proteins, etc.

SOLUTION: This new Escherichia coli mutant KY 2266 strain (FERM BP-6239) or KY 2893 strain (FERM BP-6243) has triple defective mutations in hsl V/V gene, clp PX gene and lon gene, and has a function for stabilizing unstable proteins expressed in Escherichia coli. The mutant can be transformed with a vector capable of expressing a gene encoding a foreign protein, and used for producing the foreign protein, etc. The new Escherichia coli is obtained by introducing a defective mutation into the hsl V/V gene of an Escherichia coli having double defective mutations in the PX gene and lon gene.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 24.03.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3325512

BEST AVAILABLE COPY

[Date of registration] 05.07.2002

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-313863

(43) 公開日 平成10年(1998)12月2日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00 A
C 0 7 K 14/415		C 0 7 K 14/415
	14/745	14/745
C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 1/21
	9/72	9/72

審査請求 未請求 請求項の数13 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-31718	(71) 出願人	594206705 株式会社エイチ・エス・ピー研究所 大阪市中央区道修町2丁目2番8号
(22) 出願日	平成10年(1998)2月13日	(72) 発明者	金森 正明 京都市下京区西七条南月読町32 マンション春日301号
(31) 優先権主張番号	特願平9-85914	(72) 発明者	柳 秀樹 兵庫県宝塚市花屋敷松ガ丘14番26号
(32) 優先日	平9(1997)3月19日	(72) 発明者	由良 隆 京都市左京区修学院狭間町12
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 細田 芳徳

(54) 【発明の名称】 大腸菌変異株

(57) 【要約】

【課題】大腸菌の菌体内で不安定な蛋白質を安定化する機能を有する大腸菌変異株、該大腸菌変異株の製造方法、該大腸菌変異株を用いる不安定蛋白質の安定発現方法、該大腸菌変異株を用いる大腸菌由来の不安定蛋白質の安定化方法、該大腸菌変異株に外来蛋白質をコードする遺伝子を導入して得られる形質転換体および該形質転換体を用いて不安定蛋白質を製造する方法を提供すること。

【解決手段】hs1V/U遺伝子、clpP X遺伝子及びlon遺伝子に三重欠失変異を有し、かつ、大腸菌内で発現された不安定蛋白質を安定化する機能を有する大腸菌変異株該大腸菌変異株の製造方法、該大腸菌変異株を用いる不安定蛋白質の安定発現方法、該大腸菌変異株を用いる大腸菌由来の不安定蛋白質の安定化方法、該大腸菌変異株に外来蛋白質をコードする遺伝子を導入して得られる形質転換体および該形質転換体を用いて不安定蛋白質を製造する方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 $hs1V/U$ 遺伝子、 $clpP X$ 遺伝子及び lon 遺伝子に三重欠失変異を有し、かつ、大腸菌内で発現された不安定蛋白質を安定化する機能を有する大腸菌変異株。

【請求項2】 大腸菌変異株が K12 株由来である請求項1記載の大腸菌変異株。

【請求項3】 大腸菌変異株が KY2266株 (FERM BP-6239) 又は KY2893株 (FERM BP-6243) である、請求項1記載の大腸菌変異株。

【請求項4】 $clpP X$ 遺伝子及び lon 遺伝子に二重欠失変異を有する大腸菌変異株を用いて、さらに $hs1V/U$ 遺伝子に欠失変異を導入することを特徴とする、請求項1～3いずれか記載の大腸菌変異株の製造方法。

【請求項5】 $clpP X$ 遺伝子及び lon 遺伝子に二重欠失変異を有する大腸菌変異株が KY2263株 (FERM BP-6238) 又は KY2783株 (FERM BP-6244) である、請求項4記載の製造方法。

【請求項6】 請求項1～3いずれか記載の大腸菌変異株を用いることを特徴とする、大腸菌内での不安定蛋白質の安定発現方法。

【請求項7】 不安定蛋白質が外来蛋白質である請求項6記載の安定発現方法。

【請求項8】 外来蛋白質がヒトブロウロキナーゼである請求項7記載の安定発現方法。

【請求項9】 外来蛋白質がスギ花粉抗原 $Cry j II$ である請求項7記載の安定発現方法。

【請求項10】 請求項1～3いずれか記載の大腸菌変異株を用いることを特徴とする、大腸菌由来の不安定蛋白質の安定化方法。

【請求項11】 大腸菌由来の不安定蛋白質が熱ショック転写因子 σ^{32} である請求項10記載の安定化方法。

【請求項12】 請求項1～3いずれか記載の大腸菌変異株に、外来蛋白質をコードする遺伝子を発現させるベクターを導入してなる形質転換体。

【請求項13】 請求項12記載の形質転換体を用いることを特徴とする、外来蛋白質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、大腸菌変異株に関する。さらに詳しくは、大腸菌内で発現された不安定蛋白質を安定化する機能を有する大腸菌変異株、該大腸菌変異株の製造方法、該大腸菌変異株を用いる不安定蛋白質の大腸菌内での安定発現方法、該大腸菌変異株を用いる大腸菌由来の不安定蛋白質の安定化方法、該大腸菌変異株に外来蛋白質をコードする遺伝子を導入して得られる形質転換体及び該形質転換体を用いる外来蛋白質の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 大腸菌を用いた外来遺伝子の発現による有用蛋白質の産生は、基本的にはすでに確立された技術といえるが、大腸菌の菌体内で急速に分解される蛋白質も多く、必ずしも満足できる発現量が得られるとは限らない。大腸菌内で不安定な外来蛋白質を安定に発現させる一つの手段として、プロテアーゼ遺伝子の変異株を宿主として用いることが考えられ、実際 $clpP X$ 遺伝子及び lon 遺伝子の二重変異株が外来蛋白質生産のための宿主として作製されている (特開平8-140671号公報)。しかし、種々の外来蛋白質を安定に発現させるという点において未だ有効な変異株は得られていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、前記従来技術に鑑みてなされたものであり、本発明の目的は、大腸菌の菌体内で不安定な蛋白質を安定化する機能を有する大腸菌変異株を提供することにある。本発明の他の目的は、かかる大腸菌変異株の製造方法を提供することにある。本発明のさらに他の目的は、かかる大腸菌変異株を用いる不安定蛋白質の安定発現方法を提供することにある。本発明のさらに他の目的は、かかる大腸菌変異株を用いる大腸菌由来の不安定蛋白質の安定化方法を提供することにある。本発明のさらに他の目的は、かかる大腸菌変異株に外来蛋白質をコードする遺伝子を導入して得られる形質転換体を提供することにある。本発明のさらに他の目的は、かかる形質転換体を用いて不安定蛋白質を製造する方法を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】 前記プロテアーゼには弱いながらも基質特異性が認められており、ある蛋白質は Lon により分解されるが、 Clp では分解されないということがある。したがって、新たなプロテアーゼを発見し、それらの変異を既存のプロテアーゼの変異と組み合わせることにより、様々な外来蛋白質の発現に対応可能な、蛋白質分解を抑制した宿主が開発できるものと期待される。

【0005】 本発明者らは、このような観点から、大腸菌内で折り畳みが異常になった蛋白質を処理するという機能を指標に、新規プロテアーゼ遺伝子の探索を試み、 $hs1V/U$ オペロンを単離した。 $hs1V/U$ オペロンの塩基配列は既に報告されており、また $hs1V/U$ オペロンがコードする2つの蛋白質 $Hs1V$ と $Hs1U$ はそれぞれATP依存性プロテアーゼの触媒サブユニットと調節サブユニットであることが報告されている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 5808-5813 (1996); J. Biol. Chem. 271, 14035-14040 (1996))。

【0006】 本発明者らは、 $Hs1V/U$ 蛋白質を過剰発現させた大腸菌内ではヒトブロウロキナーゼは著しく不安定になり、 $hs1V/U$ 欠失変異株では外来蛋白質として用いたヒトブロウロキナーゼが2倍程度安定化することを認めた。ところが、さらに、他のATP依存性ブ

ロテアーゼの欠失変異と組み合わせたと、驚くべきことに、*hs1V/U* 遺伝子、*clpP X* 遺伝子、*lon* 遺伝子の三重欠失変異株で、野生型はもちろん *clpP X* 遺伝子、*lon* 遺伝子の二重変異株、および *hs1V/U* 欠失変異株と比較してもヒトプロウロキナーゼが著しく安定化することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】即ち、本発明の要旨は、(1) *hs1V/U* 遺伝子、*clpP X* 遺伝子及び *lon* 遺伝子に三重欠失変異を有し、かつ、大腸菌内で発現された不安定蛋白質を安定化する機能を有する大腸菌変異株、(2) *clpP X* 遺伝子及び *lon* 遺伝子に二重欠失変異を有する大腸菌変異株を用いて、さらに *hs1V/U* 遺伝子に欠失変異を導入することを特徴とする、前記(1)記載の大腸菌変異株の製造方法、(3) 前記(1)記載の大腸菌変異株を用いることを特徴とする、大腸菌内での不安定蛋白質の安定発現方法、(4) 前記(1)記載の大腸菌変異株を用いることを特徴とする、大腸菌由来の不安定蛋白質の安定化方法、(5) 前記(1)記載の大腸菌変異株に、外来蛋白質をコードする遺伝子を発現させるベクターを導入してなる形質転換体、(6) 前記(5)記載の形質転換体を用いることを特徴とする、外来蛋白質の製造方法、に関する。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明において、大腸菌変異株とは、大腸菌内で発現された不安定蛋白質を安定化する機能を有する大腸菌変異株をいう。例えば、*hs1V/U* 遺伝子、*clpP X* 遺伝子及び *lon* 遺伝子に三重欠失変異を有し、かつ、前記機能を有する大腸菌変異株等が挙げられる。

【0009】本発明において、「不安定蛋白質」とは、大腸菌内で発現しても速やかに分解を受ける、すなわち、極めて半減期の短い蛋白質をいい、熱ショック転写因子 σ^{24} 等の大腸菌由来の蛋白質及びヒトプロウロキナーゼ、スギ花粉抗原 *Cry j II*、各種サイトカイン、成長因子等の大腸菌内での高発現が困難な外来蛋白質を含む。

【0010】本発明において、「安定化する」とは、前記不安定蛋白質の半減期を有意に延長することをいう。半減期は、例えば後述の放射標識したアミノ酸を用いるバルスーチェイス実験により、測定することができる。

【0011】前記三重欠失変異とは、*hs1V/U* 遺伝子、*clpP X* 遺伝子及び *lon* 遺伝子を、それぞれ、全部又は一部欠失させることにより、かかる遺伝子がコードするプロテアーゼが、例えば、ウエスタンブロッティング法等により、大腸菌内に検出されないことをいう。

【0012】前記三重欠失変異の大腸菌染色体中への導入は、PCR法により確認することができる。

【0013】前記三重欠失変異を導入する大腸菌株は特に制限されないが、K12株、B株等が用いられ、生物学的封じ込めの観点から、K12株が好適に用いられ

る。

【0014】本発明においては、不安定蛋白質をより安定化するという観点から、K12株の派生株であるMC4,100株[F- *araDΔ* (*argF-lac*)U169 *rpsL relA flbB deoCptsF rbsR*] の *hs1V/U* 遺伝子、*clpP X* 遺伝子及び *lon* 遺伝子に三重欠失変異を導入して得られたKY2266株(FERM BP-6239)並びにK12株の派生株であるW3110株[*thyA36 deoC2 IN(rrnD-rrnE)1 rph1*]の *hs1V/U* 遺伝子、*clpP X* 遺伝子及び *lon* 遺伝子に三重欠失変異を導入して得られた、30℃～42℃で増殖可能なKY2893株(FERM BP-6243)が、特に好ましい。

【0015】本発明の大腸菌変異株を製造する方法を、前記KY2266株及びKY2893株を例にとって、以下に詳細に説明する。特に明記しない限り、以下の方法は、例えば Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989年発行等に記載の方法を参考にして行うことができる。

【0016】まず、KY2266株の製造方法を説明する。前記MC4100株の *clpP X* 遺伝子及び *lon* 遺伝子に二重欠失変異を導入し、KY2263株を得る。次に、該KY2263株を用いてさらに *hs1V/U* 遺伝子に欠失変異を導入することにより、*hs1V/U* 遺伝子、*clpP X* 遺伝子及び *lon* 遺伝子に三重欠失変異を有するKY2266株を得る。

【0017】(1) KY2263株の製造方法

小原大腸菌整列クローン#148より、*Lon* (La) プロテアーゼ及び*Clp* プロテアーゼの触媒サブユニット*ClpP*をそれぞれコードしている*lon* 遺伝子及び *clpP* 遺伝子を周辺領域を含めて多コピープラスミドにクローニングする。*clpP* 遺伝子及び *lon* 遺伝子は大腸菌染色体上で近傍にあり、該遺伝子間には*Clp* プロテアーゼの1つである*ClpXP*の調節サブユニットである*ClpX*をコードする *clpX* 遺伝子があり、*clpP* 遺伝子とオペロンを形成している(図1)。*clpP* 遺伝子内の *MluI* 部位と *lon* 遺伝子内の *SalI* 部位間の3.7 kbpの断片をpACYC184(ATCC37033)(Chang, A. C. and Cohen, S. N., J. Bacteriol. 134, 1141-1156(1978))由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(*cat*)遺伝子(*HincII* - *NotI*断片1.6 kbp)で置換することにより、欠失変異を生じさせる(図1)。得られるプラスミドをpKV1196、欠失変異をΔ(*clpP X-lon*) 1196::catと名づける。

【0018】前記pKV1196をHindIIIで切断して直鎖状にしたDNAを用いて、*recD*変異株であるFS1576株(Stahl, F. W. et al., Genetics 113,215-227(1986))の形質転換を行う。クロラムフェニコール耐性となった形質転換体より染色体DNAを調製し、PC

Rを用いて前記欠失変異が染色体中に導入されたことを確認する。

【0019】PIファージ (Yarmolinsky, M. B. and Sternberg, N., The Bacteriophages(ed. Calendar, R.), Plenum Press, New York, vol. 1, 291-438(1988)) を用いてΔ(cIpP_X-lon) 1196::cat を野生株MC4

100株に導入する。得られた変異株は、E. coli

KY2263と命名、表示され、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305-8566)の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-6238として寄託されている(原寄託日: 1997年2月18日、国際寄託日: 1998年1月26日)。

【0020】(2) KY2266株の製造方法

SG22094株(MC4100株 cIpP1::cat Δlon-510、特開平8-140671号公報)より、Hs1V/Uプロテアーゼをコードするhs1V/Uオペロンを周辺領域を含めて多コピープラスミドにクローニングする。hs1V遺伝子内のNsiI部位とhs1U遺伝子内のNruI部位間の0.6kbの断片をpBR322由来のテトラサイクリン耐性(tet)遺伝子(EcoRI-AvaI断片1.4kb)で置換する(図2)。得られるプラスミドをpKV1172、欠失変異をΔhs1V/U1172::tetと名づける。

【0021】前記pKV1172をEcoRIで切断して直鎖状にしたDNAを用いて、FS1576株の形質転換を行う。テトラサイクリン耐性となった形質転換体より染色体DNAを調製し、PCRを用いて前記欠失変異が染色体中に導入されたことを確認する。

【0022】(1)と同様に、PIファージを用いて、Δhs1V/U1172::tetを(1)で得られたKY2263株に導入する。得られた変異株は、E. coli KY2266と命名、表示され、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305-8566)の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所にFERMBP-6239として寄託されている(原寄託日: 1997年2月18日、国際寄託日: 1998年1月26日)。

【0023】こうして得られた本発明の大腸菌変異株であるKY2266株は、親株のMC4100株や二重変異株のKY2263株と比べて、37℃、栄養培地において、成長速度、形質転換方法及び保存方法等に差異はなく、通常の操作で取り扱いができる点が有利である。

【0024】次に、KY2893株の製造方法を説明する。KY2893株の製造方法は、前記KY2266株の製造方法において、MC4100株の代わりにW3110株を用いることを除いて同様に行なう。具体的には、W3110株のcIpP_X遺伝子及びlon遺伝子に二重欠失変異を導入する。得られた変異株は、E. coli KY2783と命名、表示され、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305-8566)の

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所にFERMBP-6244として寄託されている(原寄託日: 1998年2月3日)。

【0025】次いで、該KY2783株を用いてさらにhs1V/U遺伝子に欠失変異を導入することにより、hs1V/U遺伝子、cIpP_X遺伝子及びlon遺伝子に三重欠失変異を有するKY2804株を得て、該KY2804株から30℃以上で増殖可能な変異株KY2893株を分離する。得られたこれらの変異株は、それぞれ、

E. coli KY2804及びE. coli KY2893と命名、表示され、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305-8566)の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所にFERMBP-6245及びFERMBP-6243として寄託されている(原寄託日: 1998年2月3日)。

【0026】また、こうして得られた本発明の大腸菌変異株であるKY2893株も、親株のW3110株や二重変異株のKY2783株と比べて、37℃、栄養培地において、成長速度、形質転換方法及び保存方法等に差異はなく、通常の操作で取り扱いができる点が有利である。

【0027】また、本発明は、前記大腸菌変異株を用いて、大腸菌内で不安定蛋白質を安定発現させる方法を提供する。不安定蛋白質は、外来蛋白質が好ましく、ヒトプロウロキナーゼ、スギ花粉抗原Cryj II等が本発明の大腸菌変異株により有意に安定発現されるので、さらに好ましい。

【0028】不安定蛋白質が外来蛋白質の場合、目的の外来蛋白質をコードする遺伝子をベクターに導入して組換えベクターを調製する。該ベクターは、プロモーター配列、SD配列、複製開始点、マーカー遺伝子等本発明の大腸菌変異株での発現制御に必要な配列を有するものであり、市販のpET、pTrc99A、pKK233等が用いられる。得られる組換えベクターを本発明の大腸菌変異株に導入し、マーカー遺伝子に応じた方法でコロニーを選択することにより、目的の外来蛋白質を発現する形質転換体を得る。

【0029】また、本発明は、前記形質転換体をも提供する。

【0030】次に、前記形質転換体を培養することにより、目的の不安定な外来蛋白質を安定に発現させることができる。形質転換体の培養方法は、通常の方法が用いられ、培地は栄養培地、合成培地いずれでも構わないし、培養温度は、20~42℃の範囲内で任意に選ばれるが、37℃付近が最も好ましい。

【0031】対数増殖期の形質転換体を含む培地に³⁵S-メチオニンを添加して形質転換体細胞で合成される蛋白質を1分間標識した後、過剰の非放射性メチオニンを加えるパルスチェイス実験により、目的の外来蛋白質の安定性を測定することができる。外来蛋白質の安定性

は、半減期により表される。

【0032】さらに、本発明は、前記大腸菌変異株を用いて、大腸菌由来の不安定蛋白質を安定化する方法を提供する。以下、大腸菌由来の熱ショック転写因子 σ^{32} を例にとって説明する。本発明の大腸菌変異株を前記形質転換体と同様の方法で培養することにより、大腸菌由来の不安定蛋白質を安定化することができる。該大腸菌変異株細胞から蛋白質を通常の方法で溶出する。一定量の溶出蛋白質をSDS-PAGEに付し、ニトロセルロース膜に転写後、抗 σ^{32} 抗体を用いるウェスタンブロッティング法により、 σ^{32} の発現量の最も多い大腸菌変異株を選択することができる(特開平8-140671号公報)。

【0033】前記 σ^{32} の発現量の最も多い本発明の大腸菌変異株は、 σ^{32} を分解するプロテアーゼを欠失しており、目的蛋白質の直接的な分解が抑制されるばかりでなく、 σ^{32} によって産生される大量の熱ショック蛋白質のシャペロン機能により、外来遺伝子の発現により産生された目的蛋白質をさらに安定に保持し得ることが期待されるので、特に有用である。

【0034】さらに、本発明は、前記形質転換体を用いる外来蛋白質の製造方法を提供する。前記形質転換体を前記と同様の方法で培養し、必要があれば発現誘導を行う。形質転換体からの外来蛋白質の回収及び精製は、形質転換体を破碎して遠心分離し、上清を回収し、ゲル濾過や各種のカラムクロマトグラフィー等、蛋白質の精製に使用されている通常の方法で精製すればよい(Current Protocols in Protein Science(ed. Coligan, J. E. et al.), John Wiley and Sons, Inc., Chapter 6)。また、目的蛋白質がペリプラズムに存在する場合には、Wilmskyらの方法(J. Bacteriol., 127, 595-609 (1976))等を参考にして精製することができる。

【0035】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によりなら限定されるものではない。特に明記しない限り、以下の実施例は、Sambrook, J. 著、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989年発行に記載の方法で行った。

【0036】実施例1

KY2266株の調製

小原大腸菌整列クローン#148より、Lon(La)プロテアーゼ及びClpプロテアーゼの触媒サブユニットClpPをそれぞれコードしているlon遺伝子及びclpP遺伝子を周辺領域を含めて多コピープラスミドpBR322にクローニングした。lon遺伝子及びclpP遺伝子は、大腸菌染色体上で近傍にあり、該遺伝子間にはClpプロテアーゼの1つであるClpXPの調節サブユニットであるClpXをコードするclpX遺伝子があ

り、clpP遺伝子とオペロンを形成している(図1)。

clpP遺伝子内のMluI部位とlon遺伝子内のSalI部位間の3.7kbpの断片をpACYC184(ATCC37033)(Chang, A.C. and Cohen, S. N., J. Bacteriol. 134, 1141-1156(1978))由来のcat遺伝子(NheI-HincII断片1.6kbp)で置換することにより、欠失変異を生じさせた(図1)。得られたプラスミドをpKV1196、欠失変異を Δ (clpPX-lon)1196::catと名づけた。

【0037】前記pKV1196をHindIIIで切断したDNAを用いて、recD変異株であるFS1576株(Stahl, F. W. et al., Genetics 113, 215-227(1986))の形質転換を行った。クロラムフェニコール耐性となった形質転換体より染色体DNAを調製し、PCRを用いて前記欠失変異が染色体中に導入されたことを確認した。

【0038】PIファージ(Yarmolinsky, M. B. and Sternberg, N., The Bacteriophages(ed. Calendar, R.), Plenum Press, New York, vol. 1, 291-438(1988))を用いて Δ (clpPX-lon)1196::catを野生株MC4100株に導入した。得られた変異株をKY2263株(FERM BP-6238)と名づけた。

【0039】SG22094株(MC4100株 clpP1::cat Δ lon-510, 特開平8-140671号公報)より、HsIV/UプロテアーゼをコードするhsIV/Uオペロンを周辺領域を含めて前記多コピープラスミドにクローニングした。hsIV遺伝子内のNsiI部位とhsIU遺伝子内のNruI部位間の0.6kbpの断片をpBR322由来のtet遺伝子(EcoRI-AvaI断片1.4kbp)で置換した(図2)。得られたプラスミドをpKV1172、欠失変異を Δ hsIV/U1172::tetと名づけた。

【0040】前記pKV1172をEcoRIで切断したDNAを用いて、FS1576株の形質転換を行った。テトラサイクリン耐性となった形質転換体より染色体DNAを調製し、PCRを用いて前記欠失変異が染色体中に導入されたことを確認した。

【0041】PIファージを用いて、 Δ hsIV/U1172::tetを前記KY2263株に導入した。得られた変異株をKY2266株(FERM BP-6239)と名づけた。

【0042】実施例2

KY2893株の調製

実施例1と同様にして、PIファージを用いて、 Δ (clpPX-lon)1196::catを野生株W3110株に導入した。得られた変異株をKY2783株(FERM BP-6244)と名づけた。

【0043】さらに、実施例1と同様にして、PIファージを用いて、 Δ hsIV/U1172::tetを前記KY2783株に導入した。得られた変異株をKY2804株(FERM BP-6245)と名づけた。

【0044】前記KY2804株をL液体培地中で42℃で増殖させた後、適当に希釈してL寒天培地上に塗布し、37℃又は30℃で一日培養すると、42℃での培養に比べ、コロニー数がそれぞれ、1/10又は1/1,0,000に低下した。このことにより、KY2804株が低温感受性であることがわかった。

【0045】そこで、該KY2804株をL液体培地中で42℃で一夜培養し、培養液の2μlをL寒天培地上に塗布し、30℃で1日培養した。増殖してきたコロニーから重なりのないものを選び、L寒天培地上にストリークした後、再び30℃で培養した。同様に増殖してきたコロニーをL寒天培地上にストリークし、42℃で培養して単一コロニーを分離し、30℃～42℃で増殖可能なKY2893株(FERM BP-6243)を得た。

【0046】実施例3

KY2266株中でのヒトブロウロキナーゼの安定発現方法

pUK-02pm0はlacIq 遺伝子と tacプロモーター下流にヒトブロウロキナーゼ遺伝子を持つ多コピープラスミドであり、該プラスミドで形質転換した大腸菌は培地中のIPTG濃度に依存してブロウロキナーゼを合成する(Kanemori, M. et al., J. Bacteriol. 176, 5648-5653(1994))。該プラスミドでMC4100株(野生株)、KY2263株、KY2266株を形質転換し、アンピシリン耐性によりコロニーを選択し、選択されたコロニー中のヒトブロウロキナーゼの発現をウエスタンブロッティングにより確認することにより、形質転換体を得た。得られた形質転換体をそれぞれ、30℃、合成培地(medium E)(培地1リットル当たり、MgSO₄・7H₂O 0.2g、クエン酸・H₂O 2g、K₂HPO₄ 10g、NaNH₄HPO₄・4H₂O 3.5gを含む)中で対数増殖させ、前記合成培地に最終濃度10μMとなるようにIPTGを添加し、ヒトブロウロキナーゼの合成を誘導した。IPTG添加後1時間目にサンプリングし、抗ヒトブロウロキナーゼ抗体を用いるウエスタンブロッティングによりヒトブロウロキナーゼの量を調べた。

【0047】その結果、MC4100株形質転換体と比較して、KY2263株形質転換体及びKY2266株形質転換体では有意にブロウロキナーゼの含有量が増加していた(図3)。発現速度には変化がなかったため、含有量の違いは安定性の違いを反映したものである。栄養培地(L-培地)(培地1リットル当たり、バクトトリプトン(登録商標、Difco Laboratories製)10g、酵母エキス5g、NaCl 5gを含む、pH7.4)中、37℃の培養条件においても、前記形質転換体中のヒトブロウロキナーゼの含有量に関して同様の結果が得られた。

【0048】前記と同様の方法により培養した対数増殖期の形質転換体を含む培地に、IPTG添加後、³⁵S-

メチオニン(100μCi/ml)を添加し、形質転換体細胞で合成される蛋白質を1分間標識した後、過剰の非放射性メチオニン(終濃度200μg/ml)を加えて1分後を0分とし、10、20、30、40分後の各形質転換体をサンプリングすることにより、パルスチエイス実験を行なった。

【0049】前記各形質転換体中のヒトブロウロキナーゼの含有量を免疫沈降法により定量し、半減期を測定したところ、MC4100株では10分、KY2263株では30分であるのに対し、KY2266株では40分以上であり、有意に半減期が延長されていた(図4)。

【0050】実施例4

KY2266株中でのスギ花粉抗原Cryj IIの安定発現方法

Cryj II発現ベクターpKCJ2Iを用いて、実施例3と同様の方法で、各形質転換体を得た。得られた各形質転換体を栄養培地中、37℃で培養し、対数増殖期にIPTGを最終濃度1mMとなるように培地に添加してCryj IIの合成を誘導した。1時間後にスペクチノマイシンを最終濃度500μg/mlとなるように添加し、蛋白質合成を停止させた(0分)。5、10、20、40分後の各形質転換体をサンプリングした。

【0051】前記各形質転換体中のCryj IIをウエスタンブロッティングにより定量したところ、MC4100株では半減期が7分であるのに対し、KY2263株及びKY2266株では40分経過後も、Cryj IIの残量は、それぞれ、約0.9及び約1.0とほぼ初期値を維持しており、Cryj IIが非常に安定化されていることが明らかとなった(図5)。

【0052】実施例5

KY2266株中でのσ³²の安定化

30℃、合成培地(medium E)で培養した対数増殖期のKY2266株を含む培地に、³⁵S-メチオニン(100μCi/ml)を添加し、KY2266株で合成される蛋白質を1分間標識した後、過剰の非放射性メチオニン(終濃度200μg/ml)を加えて1分後を0分とし、5、10、15、20分後のKY2266細胞をサンプリングすることにより、パルスチエイス実験を行なった。σ³²に対する抗体を用いて、各KY2266細胞中のσ³²含量を免疫沈降法により定量した。MC4100株では、半減期が約1.5分、KY2263株では半減期が約8分であるのに対し、KY2266株では半減期が約40分と有意に半減期が延長されていた。

【0053】実施例6

KY2893株中でのσ³²の安定化

37℃、栄養培地で培養した対数増殖期のW3110株、KY2783株およびKY2893株をそれぞれ含む培地に、クロラムフェニコールを最終濃度100μg/mlとなるように添加し、蛋白質合成を停止させた(0分)。0、0.5、1.0、1.5分後(W311

0株)または0、5、10、15分後(KY2783株およびKY2893株)に菌をサンプリングした。菌体中の σ^{32} をウェスタンブロッティングにより定量したところ、W3110株では半減期が約1分、KY2783株では約10分であるのに対し、KY2893株では15分後もほぼ初期値を維持しており、 σ^{32} が非常に安定化されていることが明らかとなった(図6)。

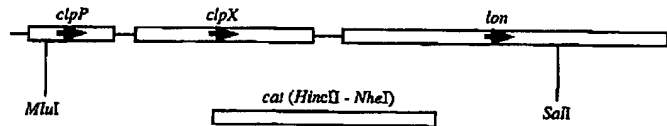
【0054】

【発明の効果】本発明によれば、大腸菌内で発現された不安定蛋白質を安定化する機能を有する大腸菌変異株、該大腸菌変異株の製造方法、該大腸菌変異株を用いる不安定蛋白質の安定発見方法、該大腸菌変異株を用いる大腸菌由来の不安定蛋白質を大腸菌内で安定化する方法、該大腸菌変異株に外来蛋白質をコードする遺伝子を導入して得られる形質転換体及び該形質転換体を用いる外来蛋白質の製造方法が提供される。本発明により、有用外来蛋白質の効率的な遺伝子工学的生産が可能となる。

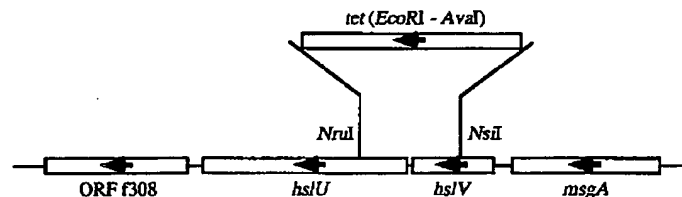
【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、*clpP* Xオペロンと*lon* 遺伝子の大腸菌染色体上での模式図及び *clpP* 遺伝子内の *Mlu*I 部位*20

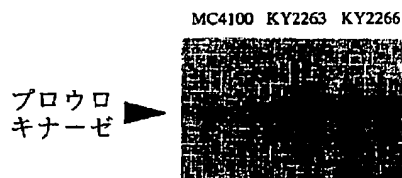
【図1】



【図2】



【図3】



*と *lon* 遺伝子内の *Sal*I 部位間の塩基配列を *cat* 遺伝子 (*Hinc*II - *Nhe*I) で置換する欠失変異を示す。矢印は、転写の方向を示す。

【図2】図2は、*hsl* V/Uオペロンの大腸菌染色体上での模式図及び *hsl* V 遺伝子内の *Nsi*I 部位と *hsl* U 遺伝子内の *Nru*I 部位間の塩基配列を *tet* 遺伝子 (*Ava*I-*Eco*RI) で置換する欠失変異を示す。矢印は、転写の方向を示す。

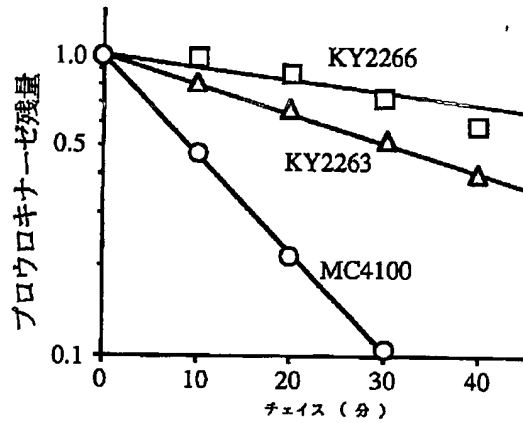
【図3】図3は、ウェスタンブロッティングによるヒトプロウロキナーゼの発現を示す電気泳動の写真である。

【図4】図4は、KY2266株を用いるヒトプロウロキナーゼの安定化を測定するためのパルス-チェイス実験の結果を示す図である。

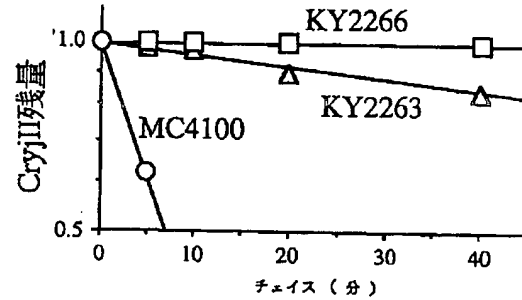
【図5】図5は、KY2266株を用いる *Cry* IIの安定化を測定するためのウェスタンブロッティングの結果を示す図である。

【図6】図6は、KY2893株を用いる σ^{32} の安定化を測定するためのウェスタンブロッティングの結果を示す図である。

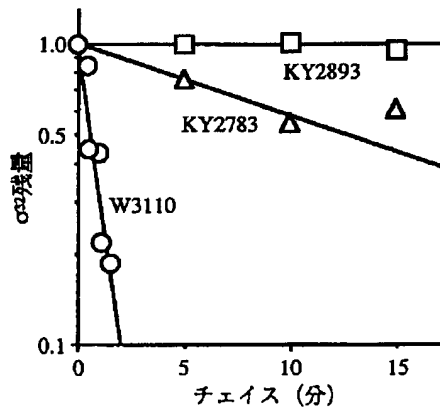
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 P 21/02

C 1 2 P 21/02

C

// (C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 9/72

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:19)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.